

4

PCT/KR 00/00026

RO/KR 21.01.2000.

HR00/26

REC'D 02 FEB 2000

WIPO PCT

대한민국 특허청

KOREAN INDUSTRIAL
PROPERTY OFFICE

별첨 사본은 아래 출원의 원본과 동일함을 증명함.

This is to certify that the following application annexed hereto
is a true copy from the records of the Korean Industrial
Property Office.

출원번호 : 특허출원 1999년 제 5580 호
Application Number

출원년월일 : 1999년 02월 19일
Date of Application

출원인 : 강용호
Applicant(s)

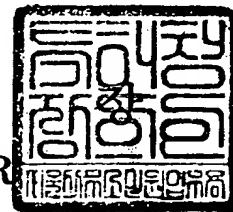
**PRIORITY
DOCUMENT**
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)



2000 년 01 월 13 일

특 허 청

COMMISSIONER



【서류명】	출원서
【권리구분】	특허
【수신처】	특허청장
【참조번호】	3
【제출일자】	1999.02.19
【발명의 명칭】	디아미노산 산화효소활성이 증진된 재조합 효소 및 그 제조방법
【발명의 영문명칭】	Recombinant enzyme with an increased D-amino acid oxidase activity and process for preparation the same
【출원인】	
【성명】	강용호
【출원인코드】	4-1999-001548-1
【대리인】	
【성명】	이덕록
【대리인코드】	9-1998-000461-7
【포괄위임등록번호】	1999-002478-9
【발명자】	
【성명】	강용호
【출원인코드】	4-1999-001548-1
【우선권주장】	
【출원국명】	KR
【출원종류】	특허
【출원번호】	10-1999-0000865
【출원일자】	1999.01.14
【증명서류】	첨부
【심사청구】	청구
【미생물기탁】	
【기탁기관명】	한국과학기술연구원 부설 생명공학연구소
【수탁번호】	KCTC 8923P
【수탁일자】	1999.01.18
【취지】	특허법 제42조의 규정에 의한 출원, 특허법 제60조의 규정에 의한 출원심사를 청구합니다. 대리인 이덕록 (인)

【수수료】

【기본출원료】	13	면	29,000	원
---------	----	---	--------	---

【가산출원료】	0	면	0	원
---------	---	---	---	---

【우선권주장료】	1	건	26,000	원
----------	---	---	--------	---

【심사청구료】	5	항	269,000	원
---------	---	---	---------	---

【합계】	324,000	원		
------	---------	---	--	--

【감면사유】	개인			
--------	----	--	--	--

【감면후 수수료】	175,000	원		
-----------	---------	---	--	--

【첨부서류】	1. 요약서·명세서(도면)-1통			
--------	-------------------	--	--	--

【요약서】

【요약】

본 발명은 디아미노산 산화효소활성이 증진되어 고수율로 세파로스포린씨를 생변환시키는 재조합 효소에 관한 것으로 박테리아 헤모글로빈 (*Vitreoscilla* hemoglobin; VHb)과 디아미노산 산화효소(D-amino acid oxidase; D-AAO) 유전자를 고분자 중합반응(polymerase chain reaction; PCR)으로 융합하여 클로닝한 다음 대장균(*Escherichia coli*)에서 발현시킨 후 배양한 다음 분리정제한 본 발명 VHb-DAAO 재조합 효소는 디아미노산 산화효소의 활성이 증진되어 세파로스포린씨의 생변환수율을 향상시키는 뛰어난 효과가 있다.

【대표도】

도 1

【색인어】

디아미노산 산화효소, 박테리아 헤모글로빈, 세파로스포린씨, 세파계 항생제, 융합유전자

【명세서】

【발명의 명칭】

디아미노산 산화효소활성이 증진된 재조합 효소 및 그 제조방법{Recombinant enzyme with an increased D-amino acid oxidase activity and process for preparation the same

【도면의 간단한 설명】

도 1은 발현벡터에 VHb-DAAO 융합유전자를 도입하는 벡터 모식도를 나타낸다.

【발명의 상세한 설명】

【발명의 목적】

【발명이 속하는 기술분야 및 그 분야의 종래기술】

- ❧ 본 발명은 디아미노산 산화효소활성이 증진된 재조합 효소 및 그 제조방법에 관한 것이다. 더욱 상세하게는, 본 발명은 디아미노산 산화효소 유전자와 박테리아 헤모글로빈 유전자의 융합 유전자를 발현시켜 제조한 재조합 효소와 상기 재조합 효소의 제조방법에 관한 것이다.
- ❧ 반합성 세파계 항생제는 다른 항생제에 비하여 안정성이 높고 항균성이 광범위하여 세계 항생제 시장의 약 40%를 차지하고 있다. 반합성 세파계 항생제는 미생물 발효산물인 세파로스포린씨 (cephalosporin C)를 정제하여 화학적인 방법으로 7번위치의 아미노아디필(aminoadipyl) 잔기를 절단하여 만든 세븐아미노세파로스포릭산 (7-aminocephalosporanic acid, 7-ACA)를 출발물질로 하고 있다. 이와 같은 화학적인 제

조방법은 유해한 화공약품 때문에 필연적으로 환경오염을 유발하며, 대부분이 극저온에서 반응이 이루어지므로 에너지 소요량도 많다. 또한 최종제품에 들어있는 잔류 유기용매에 대한 국제적 규제도 강화되고 있어서 세븐아미노세파로스포릭산

(7-aminocephalosporanic acid)을 제조하는데 있어서 기존의 화학적인 방법 대신 미생물의 효소에 의한 생물공정법 개발의 필요성이 점차 증가하고 있다. 미생물의 효소에 의한 생물공정법은 실온의 수용액상에서 반응이 진행되기 때문에 에너지 수요면에서나 폐수 처리를 위한 특수시설이 불필요하여 세븐아미노세파로스포릭산 (7-aminocephalosporanic acid)의 제조 단가를 대폭 낮출수 있는 장점이 있다. 미생물 효소에 의한 방법으로 세븐아미노세파로스포릭산 (7-aminocephalosporanic acid)을 생산하기 위해서는 두단계의 효소반응이 필요하다. 첫단계는 디아미노산 산화효소(D-amino acid oxidase)에 의하여 세파로스포린씨 (cephalosporin C)가 글루타릴세븐에이씨에이(glutaryl-7ACA)로 생변환되고, 둘째단계에서는 글루타릴세븐에이씨에이 아실레이즈(glutaryl-7ACA acylase) 효소에 의하여 글루타릴세븐에이씨에이(glutary 1-7ACA)가 세븐에이씨에이(7-ACA)로 생변환된다.

<4> 지금까지 디아미노산 산화효소(D-amino acid oxidase)는 트리고노프시스 베리어빌리스(

Trigonopsis variabilis), 로도토룰라 그라실리스(*Rhodotorula gracilis*), 로도토룰라 클루티니스(*Rhodotorula glutinis*), 푸사리움 솔라나이(*Fusarium solani*) 등의 진핵균에

있는 디아미노산 산화효소(D-amino acid oxidase)를 세파로스포린씨 (cephalosporin C) 생물전환 반응에 이용하여 왔다. 디아미노산 산화효소(D-amino acid oxidase)는 FAD를 조효소로 갖고 있기 때문에 세파로스포린씨(cephalosporin C)를 산화하기 위해서는 전자 수용체로서 항상 산소가 필요하다. 산소는 수용액에서 용해도가 극히 낮기 때문에 디아미노산 산화효소(D-amino acid oxidase) 반응을 진행시키기 위해서는 생물반응기에 충분한 산소공급을 계속해야한다. 대부분의 효소생물반응기는 효소의 재사용을 위하여 효소를 재질에 고정하여 사용하고 있다. 효소를 재질에 고정하면 재질내로의 산소분자 확산이 용이하지 않아서 세파로스포린씨 (cephalosporin C) 생변환 수율이 매우 낮다. 이런 문제점을 해결하기 위해서는 생물반응기내의 산소 분압을 높여야 하나 이런 방법은 고압에 견딜수 있는 특수한 생물반응기의 제작이 필요하고 불필요한 산소의 소모량이 많아서 비경제적이다. 따라서 본 발명자들은 디아미노산 산화효소 (D-amino acid oxidase)를 재질에 고정할 때 박테리아의 헤모글로빈 (*Vitreoscilla hemoglobin*)을 사용하여 산소공급 부족 현상을 해결하므로써 세파로스포린씨 (cephalosporin C) 생변환 수율을 향상시키고자 하였다.

- <5> 본 발명의 목적은 디아미노산 산화효소활성의 안정성 및 활성이 증진된 재조합 효소를 제공함에 있다. 본 발명의 다른 목적은 디아미노산 산화효소 유전자와 박테리아 헤모글로빈 유전자의 융합 유전자를 발현시켜 고수율로 세파로스포린씨를 생변환시키는 상기 재조합 효소의 제조방법을 제공함에 있다.

【발명이 이루고자 하는 기술적 과제】

- <6> 본 발명의 상기 목적은 비트리오실라의 헤모글로빈(*Vitreoscilla* hemoglobin; VHb) 과 디아미노산 산화효소(D-amino acid oxidase; D-AAO) 유전자를 고분자중합반응 (polymerase chain reaction, PCR)으로 융합하여 클로닝한 다음 대장균(*Escherichia coli*)에서 발현시키고 대장균에서 발현된 VHb-DAAO 재조합 효소를 분리정제한 후 폴리아 크릴아마이드 (polyacrylamide) 재질에 고정하여 세팔로스포린씨 생변환 반응을 실시하 므로써 달성하였다.
- <7> 이하 본 발명의 구성 및 작용을 설명한다.

【발명의 구성 및 작용】

- <8> 본 발명은 헤모글로빈(*Vitreoscilla* hemoglobin; VHb) 유전자와 디아미노산 산화효 소(D-amino acid oxidase; D-AAO) 유전자를 증폭하여 단편을 정제한 후 혼합하여 VHb 유 전자 5' 말단부위와 D-AAO 유전자 3' 말단부위의 프라이머를 사용하여 VHb-DAAO 융합유전 자를 제조하는 단계; 상기와 동일하게 증폭시킨 VHb 유전자와 D-AAO 유전자를 혼합한 후 프라이머를 사용하지 않고 중합반응을 시행하여 VHb-DAAO 융합유전자를 제조하는 단계; 상기 제조한 VHb-DAAO 융합유전자를 발현벡터에 클로닝하는 단계 및; VHb-DAAO 융합유전 자가 도입된 발현벡터를 대장균에 도입하여 발현시킨 후 생성된 본 발명 VHb-DAAO 재조 합 효소와 종래 D-AAO 효소의 세팔로스포린씨 생변환 반응을 반응부산물로 생성되는 H_2O_2 의 양을 발광으로 탐지하여 측정하는 단계로 구성된다.
- <9> 본 발명에서 사용한 비트리오실라의 헤모글로빈(*Vitreoscilla* hemoglobin) 유전자는 미

국 일리노이 기술연구소(Illinois Institute of Technology)에 있는 Benjamin C. Stark 교수에게서 pUC8:16 벡터를 분양받았으며 문헌에 발표된 유전자 배열을 참고하여

(Khosla and Bailey, 1988, Mol. Gen. Genet, 214:158-161; Dikshit and Webster, 1988: Gene 70:377-386) 자체 프로모터(promoter) 부위를 제거하고 Vhb 유전자만 증폭하였다. 디아미노산 산화효소(D-amino acid oxidase) 는 미국 균주은행 (American Type Culture Collection, ATCC)에서 트리코노프시스 베리어빌리스(*Trigonopsis variabilis* ATCC10679) 와 로도토룰라 그라실리스 (*Rhodotorula gracilis* ATCC26217) 를 구입하여 염색체 DNA에서 D-AAO 효소 유전자(cDNA)를 증폭하였다. 유전자 클로닝 및 발현벡터는 상업용인 pALTER-EX2 (Promega, USA)와 pKK223-3 (Pharmacia Biotech, Sweden)를 사용하였다. 각 유전자 증폭을 위하여 사용한 고분자중합반응액 조성은 표 1과 같다. 또 PCR 반응은 ThermoJet (EquiBio, Belgium) 기기를 사용하여 94℃에서 1분, 55℃에서 1분, 72℃에서 1분으로 35회 반복시키고 마지막으로 74℃에서 4분간 더 반응시켰다.

<10> 【표 1】

고분자중합반응액 조성

	DNA	25mM MgCl ₂	10X 버퍼	dH ₂ O	2.5mM dNTP	Taq 폴리머레이즈	프라이머
Vhb	1 μ l	4 μ l	10 μ l	79 μ l	1 μ l	5 유닛	200pM
T. variabilis	2 μ l	4 μ l	10 μ l	79 μ l	1 μ l	5 유닛	200pM
R.gracilis	2 μ l	4 μ l	10 μ l	79 μ l	1 μ l	5 유닛	200pM

<11> 본 발명에서 사용한 D-AAO 활성 탐지를 위한 발광분석법은 세파로스포린씨

(cephalosporin C) 생변환 반응시 D-AAO 효소의 활성을 빠르고 간편하게 측정하기 위하여 반응 부산물로 생성되는 H₂O₂의 양을 발광으로 탐지하는 하기와 같은 분석방법을 개

발하였다.

<12> $D\text{-AAO} + \text{세팔로스포린씨} + \text{H}_2\text{O} + \text{O}_2 \rightarrow \text{AKA-7ACA} + \text{NH}_3 + \text{H}_2\text{O}_2$

<13> $\text{H}_2\text{O}_2 + 2\text{OH}^- + \text{루미놀} + \text{퍼옥시다아제} \rightarrow 4\text{아미노프탈레이트} + \text{N}_2 + 2\text{H}_2\text{O} + \text{발광}$

<14> 즉, 본 발명의 재조합 벡터를 대장균에 형질전환한 다음 LB 배지에 하루밤 배양하여 원심분리로 회수하고 인산 완충용액(pH7)으로 세척하였다. 세척한 균주에 세팔로스포린씨 20mM, 루미놀 2mM, 퍼옥시다아제 1 unit, FAD $5\mu\text{M}$ 이 든 용액을 넣고 루미노메터 (Tuner design, USA)로 20초동안 방출되는 빛의 양을 측정하였다. 생성된 H_2O_2 양은 표준 직선을 이용하여 계산하였다.

<15> 이하, 본 발명의 구체적인 방법을 실시예를 들어 상세히 설명하고자 하지만 본 발명의 권리범위는 이들 실시예에만 한정되는 것은 아니다.

<16> 실시예 1: PCR 에 의한 VHb-DAAO 유전자 융합

<17> 본 실시예에서는 VHb 유전자의 5' 말단부위와 D-AAO 유전자의 5' 말단부위를 중복시킨 VHb 유전자 3' 말단부위를 프라이머(primers)로 사용하여 VHb 유전자를 증폭하였다. 또한 D-AAO 유전자 3' 말단부위와 VHb 유전자 3' 말단부위와 중복시킨 D-AAO 유전자 5' 말단부위를 프라이머로 사용하여 D-AAO 유전자를 증폭하였다. 이렇게 증폭된 유전자 단편을 정제한 후 함께 혼합하고 VHb 유전자 5' 말단부위와 D-AAO 유전자 3' 말단부위의 프라이머를 사용하여 VHb-DAAO 융합 유전자를 제조하였다. 이때의 PCR 반응액 조성은 표 2와 같으며 PCR 반응은 94°C 에서 1분, 55°C 에서 1분, 72°C 에서 1분으로 35회 반복하고 마지막으로 74°C 에서 4분간 더 반응시켰다.

<18> 【표 2】

VHb-DAAO 유전자 융합을 위한 PCR 반응액 조성.

	DNA	MgCl ₂ (25mM)	10X버퍼	dH ₂ O	dNTP (2.5mM)	Taq 폴리머레이즈	프라이머
VHb	1 μ l	4 μ l	10 μ l	78 μ l	1 μ l	5유니트	200pM
D-AAO	1 μ l	4 μ l	10 μ l	78 μ l	1 μ l	5유니트	200pM

<19> 실시예 2: DNA shuffling 에 의한 VHb-DAAO 유전자 융합

<20> 상기 실시예 1에서 증폭한 VHb와 D-AAO 유전자 단편을 정제한 후 함께 혼합하고 프라이머를 사용하지 않고 중합반응을 시행하여 VHb-DAAO 융합 유전자를 제조하였다. 이때의 PCR 반응액 조성은 표 3과 같으며 중합반응은 94℃에서 1분, 55℃에서 1분, 72℃에서 1분으로 35회 반복시키고 마지막으로 74℃에서 4분간 더 반응시켰다.

<21> 【표 3】

VHb-DAAO 유전자 융합을 위한 반응액 조성

	DNA	MgCl ₂	10X 버퍼	dH ₂ O	dNTP (2.5mM)	Taq 폴리머레이즈
VHb	10 μ l	4 μ l	10 μ l	64 μ l	1 μ l	5유니트
D-AAO	10 μ l	4 μ l	10 μ l	64 μ l	1 μ l	5유니트

<22> 실시예 3: VHb-DAAO 융합유전자 클로닝

<23> 상기 실시예 1과 2에서 증폭된 VHb-DAAO 융합유전자의 단편을 블런트 말단(blunt end)으로 만들기 위하여 Klenow fragment 4 unit, dNTP(2.5mM) 3 μ l, 10X 버퍼 3 μ l 와 혼합하여 25℃에서 30분간 반응시켰다. 여기에서 얻은 반응액을 에틸알콜로 침전시켜 회수한 후, 5'말단 부위를 인산화하기 위하여 10X 버퍼 2 μ l, T4 polynucleotide kinase 1 unit

를 혼합한 후 37℃에서 1시간 반응시켰다. 여기에서 얻은 반응액을 다시 에틸알콜로 침전하여 회수한 후 발현백터에 클로닝하였다. 발현백터는 도 1의 백터 모식도에 나타낸 바와 같이 pALTER-Ex2 의 *StuI* 부위와 pKK223-3 의 *SmaI* 부위를 제한효소로 절단하여 알카라인 포스페이트(Alkaline phosphatase)로 탈인산화한 후 준비한 VHb-DAAO 융합유전자 의 단편과 T4 DNA 라이게아제를 넣고 16℃에서 1시간 반응시켰다.

<24> 실시에 4: 충전식 생물반응기에서 세팔로스포린씨 생변환 반응

<25> 상기 실시에 3에서 제조한 백터를 대장균에 형질전환한 다음 LB 배지에 하룻밤 배양하여 세포추출액을 제조하였다. 세포추출액을 황산암모늄염으로 침전하여 투석한 후 음이온교환수지(DEAE-Sephadex FF)를 통과하여 D-AAO 및 VHb-DAAO 효소를 각각 정제하였다. 정제한 효소를 폴리아크릴아마이드 재질에 포괄하여 정육면체 형태 (1.5x1.5x1.5 mm)로 절단한 다음 충전식 생물반응기(직경1.5cm, 길이15cm)에 넣었다. Tris-HCl (pH8) 완충용액으로 20mM 세팔로스포린씨 용액을 제조하고 충전식 생물반응기에 펌프(peristaltic pump)로 용액을 순환시켰다. 유속은 1.5mL/min를 유지하였으며 산소공급을 위하여 공기를 회분식 용기에 계속적으로 공급하였다. 일정시간당 시료를 채취하여 세팔로스포린씨 생변환 반응으로 생성되는 H_2O_2 양을 측정하였다. 실험결과, 표 4에 나타낸 바와 같이 D-AAO 효소고정반응기에서는 재질내의 물질확산저항에 의한 산소의 결핍으로 반응 부산물인 H_2O_2 가 거의 생성되지 않는 반면 VHb-DAAO 효소고정반응기에서는 45분만에 D-AAO 효소고정반응기의 12 배에 해당하는 H_2O_2 가 생성되었다. 따라서 VHb-DAAO 융합효소를 사용하면 세팔로스포린씨 생변환 반응시 생물반응기내의 산소 분압을 높이지 않고도 효과적인 생물전환반응을 수행할 수 있었다.

- <26> 본 발명에서 Vhb-DAAO 융합 유전자가 삽입된 벡터 pALTER-Ex2로 형질전환된 대장균은 생명공학연구소내 유전자은행에 1999년 1월 18일 기탁번호 KCTC 8923P로 기탁하였다.

<27> 【표 4】

세팔로스포린씨 생변환 반응시 시간당 생성된 H_2O_2 양 비교.

시간(분)		0	15	30	45	60	90	120
$H_2O_2(\mu M)$	D-AAO	0	0.5	0.5	0.8	1.0	1.0	1.0
	Vhb-DAAO	0	2.0	4.5	12.0	12.0	12.0	12.0

【발명의 효과】

- <28> 상기 실시예를 통해 설명한 바와 같이 본 발명은 비트리오실라의 헤모글로빈 (Vitreoscilla hemoglobin, Vhb) 유전자와 디아미노산 산화효소(D-amino acid oxidase) 유전자를 융합한 융합유전자를 대장균에서 발현시켜 Vhb-DAAO 재조합 효소를 생산하였고 생산된 본 발명 Vhb-DAAO 재조합 효소는 디아미노산 산화효소 활성이 증진되어 고수율로 세팔로스포린씨를 글루타릴세븐에이씨에이로 생변환시키는 뛰어난 효과가 있으므로 생물 의약 산업상 매우 유용한 발명인 것이다.

(별지 제4호 서식)

미생물 수탁번호 통지서

1999. 년 1 월 13 일 제 1449 호로 귀하가 보관 기탁 신청한
미생물에 대하여 이를 수탁하고 다음과 같이 미생물 수탁번호를
통지합니다.

— 다 음 —

1. 미생물의 명칭 : *Escherichia coli* WY2
2. 미생물 수탁번호 : KCTC 8923P

1999 년 1 월 18 일

생명과학연구소장 (인)

장 용 호 귀하

【특허청구범위】**【청구항 1】**

박테리아 헤모글로빈 유전자와 디아미노산 산화효소 유전자를 융합시킨 융합유전자 Vhb-DAAO를 발현시켜 얻은 세파로스포르린씨를 글루타릴세븐에이씨에이로 생변환시키는 Vhb-DAAO 재조합 효소.

【청구항 2】

제 1 항에 있어서, 상기 박테리아 헤모글로빈은 비트리오실라 헤모글로빈 또는 비트리오실라 헤모글로빈과 유사한 산소함유 기능이 있는 단백질의 전부 또는 일부분을 포함함을 특징으로 하는 Vhb-DAAO 재조합 효소.

【청구항 3】

박테리아 헤모글로빈과 디아미노산 산화효소 유전자를 고분자중합반응으로 융합하여 클로닝한 다음 벡터에 삽입하여 대장균에서 발현시킨 후 발현된 Vhb-DAAO 재조합 효소를 분리정제하는 Vhb-DAAO 재조합 효소 제조방법.

【청구항 4】

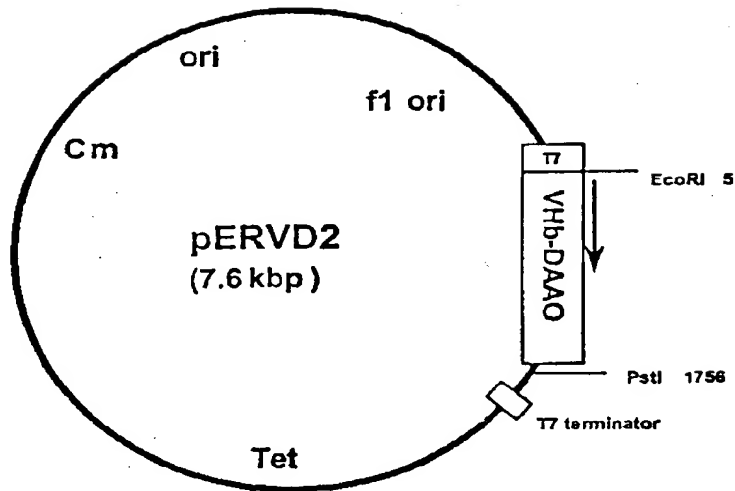
박테리아 헤모글로빈 유전자와 디아미노산 산화효소 유전자가 융합된 융합유전자를 발현벡터 pALTER-EX2에 도입하여 제작한 재조합 벡터 pALTER-EX2/Vhb-DAAO.

【청구항 5】

제 4항 기재의 상기 재조합 벡터 pALTER-EX2/Vhb-DAAO를 대장균에 도입하여 형질전환시킨 재조합 대장균(KCTC 8923P).

【도면】

【도 1】



보기 Cm: 크로람페니콜 저항 유전자 코딩지역

Tet: 테트라사이클린 저항 유전자 코딩지역

T7: T7 RNA 폴리머라제 프로모터